



#R

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 04 AUG 2003	
WIPO	PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

N. **MI2002 A 000809**

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

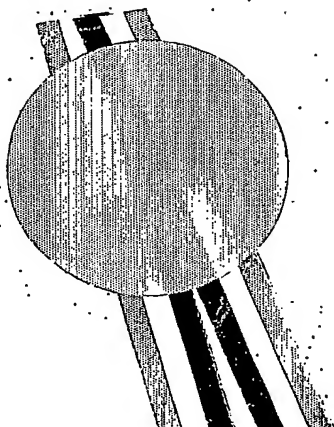


Roma, li **27 MAG. 2003**

IL DIRIGENTE
ING. DI CARLO

[Signature]

BEST AVAILABLE COPY



RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA MI2002A 000000000 000809 REG. A

DATA DI DEPOSITO

17/1/942002

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

11/11/1111

D. TITOLO

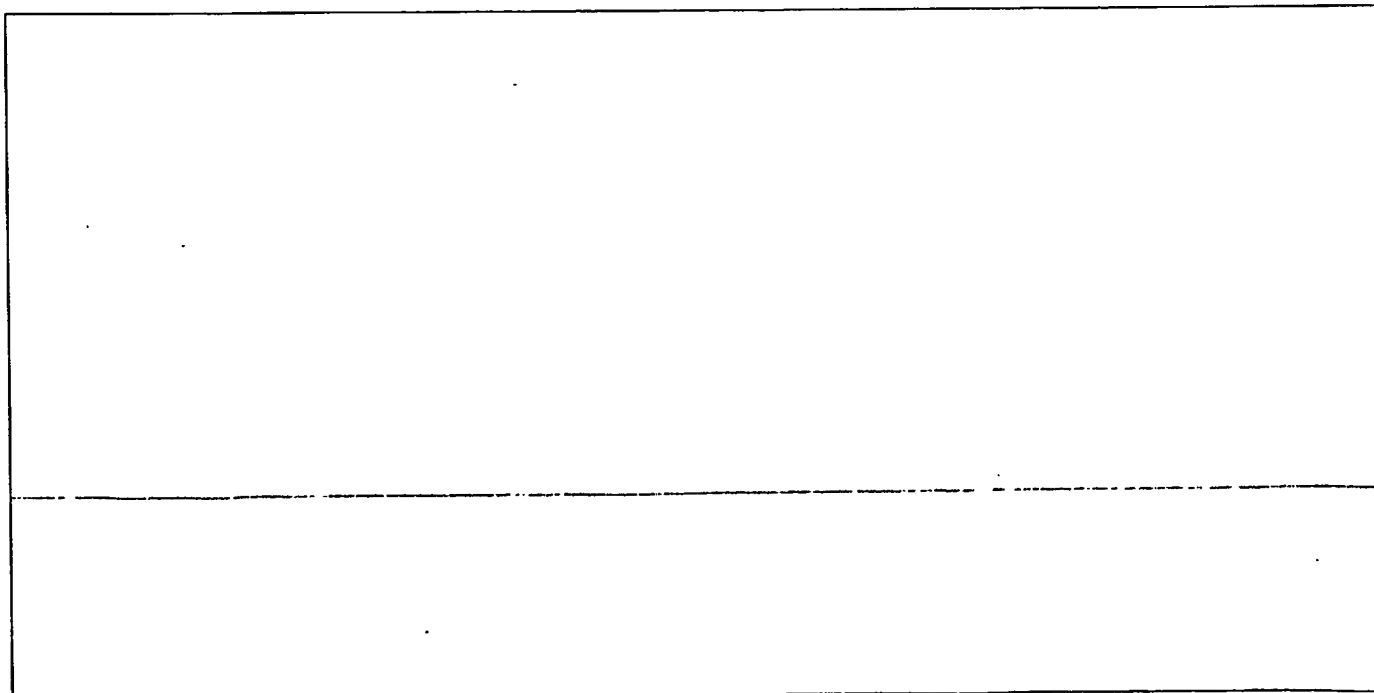
Metodo per la selezione di composti utili nel trattamento della corea di Huntington

L. RIASSUNTO

La presente invenzione descrive un metodo di screening per individuare molecole utili nella prevenzione e/o trattamento della corea di Huntington caratterizzato dal valutare la capacità di dette molecole nell'inibire l'attività della sequenza NRSE; il metodo viene eseguito incubando dette molecole in un sistema cellulare opportunamente ingegnerizzato per visualizzare il grado di attivazione della sequenza NRSE. L'invenzione descrive inoltre il procedimento di preparazione del suddetto sistema cellulare, i vettori utilizzati in questo processo, e l'uso di molecole inibitrici dell'attività della sequenza NRSE per la preparazione di farmaci utili per il trattamento e/o prevenzione della corea di Huntington.



M. DISEGNO



Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"Metodo per la selezione di composti utili nel trattamento della corea di Huntington"

a nome di: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

con sede in: MILANO

Inventori designati : CATTANEO Elena, ZUCCATO Chiara



MI 2002 A 0 0 0 8 0 9

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si colloca nel campo della terapia delle malattie del sistema nervoso centrale e in modo particolare nel campo dello screening di farmaci attivi sulla corea di Huntington.

TECNICA ANTERIORE

La corea di Huntington è una malattia genetica ereditaria a carattere dominante, ad insorgenza ritardata e penetranza variabile. Il danno neurologico sotteso a questa malattia è costituito dalla degenerazione dei neuroni striatali dei gangli della base, aree cerebrali deputate al controllo dei movimenti involontari.

La progressione della corea di Huntington è lenta e inesorabile e il paziente perde progressivamente capacità motorie, di apprendimento e stabilità psichica (Hayden MR Huntington's chorea, Springer-Verlag: London, Berlin, Heidelberg. 1981). Nella maggioranza dei casi si manifesta in età fertile (verso i 35 anni) con una incidenza di un caso su 10.000 ed una durata media di malattia di circa 17 anni fino al decesso. Spesso immediatamente consci della loro situazione e del loro futuro, anche prima di evidenti alterazioni comportamentali, gli individui affetti

A handwritten signature in black ink, located at the bottom right of the page.

dalla corea tendono ad isolarsi e ad interrompere qualsiasi tipo di rapporto lavorativo e sociale. Oltre alle conseguenze per il paziente e per i suoi famigliari, il lungo decorso clinico fa sì che questa patologia presenti un costo economico molto elevato per la società.

Il difetto genico responsabile della malattia è stato identificato nel 1993 e consiste in una mutazione all'interno di un gene codificante una proteina a funzione neuroprotettiva denominata huntingtina.

La mutazione nel gene consiste in una espansione aberrante della tripletta nucleotidica CAG presente all'inizio della sequenza codificante il gene e che nella proteina codifica l'aminoacido glutamina. Nella malattia, l'huntingtina ha dunque a livello dell'estremità' N-terminale una poliglutamazione che porta alla formazione di una diversa proteina (huntingtina mutata) che acquista un effetto tossico (meccanismo del *gain of function*). Oltre a questo meccanismo, la mutazione determina anche la perdita della funzione neuroprotettiva della proteina (meccanismo del *loss of function*). La perdita della funzione normale della proteina, unita all'acquisto di funzione tossica propria della proteina mutata, provoca la progressiva degenerazione delle cellule striatali deputate al controllo dei movimenti involontari e quindi la comparsa della sintomatologia coreica.

Recentemente è stato scoperto che in condizioni fisiologiche la funzione normale dell'huntingtina é quella di stimolare la produzione di una neurotrofina (il BDNF, Brain-Derived Neurotrophic Factor, appartenente alla famiglia dell'NGF, Nerve Growth Factor) (Zuccato, Science 2001, 293, pp. 493-8) che favorisce la sopravvivenza dei neuroni del sistema



nervoso centrale, ed in particolare dei neuroni striatali che nella patologia rappresentano la popolazione maggiormente colpita.

In particolare, è stato evidenziato che l'huntingtina fisiologicamente presente nell'organismo (qui identificata come "huntingtina normale") stimola la produzione del fattore trofico BDNF aumentando la trascrizione del gene che codifica per questa proteina. Tale funzione è persa nella malattia e di conseguenza, la ridotta disponibilità di BDNF costituisce la causa della degenerazione dei neuroni striatali che risultano privati di una proteina fondamentale per la loro sopravvivenza (Zuccato, 2001 op. cit.).

La struttura del gene preposto alla produzione del BDNF è nota (e rappresentata in modo schematico nella **figura 1**), al contrario, poco è risaputo a riguardo dei meccanismi di trascrizione di questo gene. In particolare, nessuno studio ha evidenziato l'esistenza di una sequenza all'interno del gene del BDNF capace di funzionare da bersaglio per l'azione dell'huntingtina normale.

Attualmente non sono disponibili terapie specifiche, né di tipo preventivo né curativo, per i pazienti affetti dalla malattia di Huntington. I movimenti coreiformi tipici di questa malattia possono essere ridotti, solo parzialmente, con antipsicotici o reserpina (Merck Manual, Ed. Merck Res.Laboratories, 17th ed., 1999, 1464); è pertanto evidente l'interesse per ogni approccio farmacologico che possa risultare nello sviluppo di farmaci in grado di ritardare la comparsa della malattia, di ridurne la gravità e/o di rallentarne il decorso.

SOMMARIO

La presente invenzione è basata sull'individuazione, da parte dei Richiedenti, del bersaglio molecolare dell'huntingtina normale, cioè la sequenza minima di DNA necessaria perchè l'huntingtina eserciti la sua azione sulla trascrizione del gene BDNF e quindi sviluppi la sua azione neuroprotettiva. Questa sequenza bersaglio è una sequenza palindromica di 53 paia di basi

(5'-TCCATTCAGCACCTTGGACAGAGCCAGCGGATTTGTCCGAGGT GGTAGTACTT-3'), contenuta all'interno della porzione promotrice II del gene BDNF. Tale sequenza, denominata NRSE (Neuron Restrictive Silencer Element), è di per sé già nota e riscontrata in vari geni.

I Richiedenti hanno ora individuato che questa sequenza, all'interno del gene BDNF, funziona da bersaglio molecolare per l'huntingtina normale, regolando così la sua funzione neurotrofica e neuroprotettiva. Più specificamente, la sequenza NRSE ha una funzione silenziatrice del gene BDNF: l'huntingtina normale, agendo su tale sequenza ne blocca l'attività silenziatrice e ciò si traduce in una stimolazione dell'attività trascrizionale del gene BDNF. Ancora più specificamente, è stato riscontrato dai Richiedenti che tale blocco avviene mediante il sequestro nel citoplasma del fattore principale che consente l'attivazione della sequenza NRSE. Tale fattore è chiamato REST (Restriction-Element-Silencer Factor) e si tratta di una proteina che, grazie alla presenza di 9 motivi strutturali specifici per il legame al DNA, è in grado di legarsi alla sequenza NRSE impedendo l'espressione dei geni regolati da quest'ultima.



A handwritten signature in dark ink, consisting of stylized, cursive letters.

La presente invenzione sfrutta questi trovati in un metodo di screening al fine di individuare molecole che, funzionando come l'huntingtina normale, possano essere utili nella prevenzione e/o trattamento della corea di Huntington. L'invenzione comprende un sistema cellulare per l'esecuzione del suddetto metodo di screening, un vettore per la preparazione di questo sistema cellulare e l'uso di molecole inibitrici dell'attività silenziatrice della sequenza NRSE il cui scopo è la preparazione di farmaci per il trattamento della corea di Huntington.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

La figura 1 rappresenta in modo schematico l'organizzazione del gene per la neurotrofina BDNF con la sua regione codificante la proteina in grigio e la regione promotrice a monte del box grigio. La regione promotrice è caratterizzata dalla presenza di quattro sequenze ognuna in grado di attivare in modo indipendente e stimolo-specifico la trascrizione del gene per il BDNF. Queste sequenze sono indicate in figura con i numeri I, II, III e IV. A monte della sequenza promotrice II è localizzato l'elemento silenziatore NRSE. Con il numero V è indicata, invece, la porzione genica codificante per la proteina BDNF.

Figura 2

Valutazione dell'attività del gene reporter CAT (cloramfenicolacetiltransferasi) in cellule parentali (P) ed in cellule ingegnerizzate per sovraesprimere la proteina huntingtina normale e mutata (FLwt e Flmu rispettivamente, precedentemente ottenute nel laboratorio, Rigamonti 2000) dopo trasfezione dei costrutti BDNF II 1.1 CAT (pannello A) e BDNF II 0.3 CAT (pannello B). In particolare, il



costrutto BDNF II 1.1 CAT contiene una porzione di promotore II costituita da 1100 paia di basi, mentre il costrutto BDNF II 0.3 CAT contiene una parte più piccola, composta da 300 paia di basi, della stessa sequenza. Entrambe le sequenze descritte contengono al loro interno l'elemento silenziatore NRSE. Nei pannelli A e B, le frecce indicano la traccia del cloramfenicolo acetilato. Questo esperimento consente di osservare che in cellule FLwt l'attività CAT è notevolmente aumentata rispetto al controllo rappresentato dalle cellule P non ingegnerizzate. In cellule FLmu, in presenza dell'huntingtina mutata, l'attività CAT è drasticamente ridotta. Ciò è stato verificato con entrambi i costrutti.

Figura 3

RT-PCR semiquantitative radioattive su sette geni (pannelli da A a G), diversi dal BDNF, ma caratterizzati dalla presenza della sequenza NRSE all'interno del loro promotore.

A = Colina acetil transferasi (ChAT); B = Dinamina I; C = Subunità M4 recettore muscrinico; D = Subunità B2 del recettore nicotinico; E = Proenkefalina; F = Sinapsina I; G = VchAT.

Il saggio, condotto in cellule parentali (P) o ingegnerizzate per sovraesprimere la proteina huntingtina normale e mutata (FLwt e FLmu), evidenzia che in presenza di proteina normale (FLwt) c'è un'aumentata espressione genica e che questo effetto si riduce in presenza della proteina mutata (FLmu).

Figura 4

Saggio EMSA (Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay) condotto con estratti



citoplasmatici (C) e nucleari (N) ottenuti da cellule parentali (P) e da cellule sovraesprimenti huntingtina normale e mutata (FLwt e FL mu) e incubati con la sequenza di DNA dell'elemento NRSE resa precedentemente radioattiva.

I complessi (indicati con i numeri 1 e 2), costituiti da tale sequenza e dai fattori in grado di legarla, vengono risolti tramite corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide in condizioni non denaturanti ed infine evidenziati mediante autoradiografia. Questo esperimento mostra come nel citoplasma (C) di cellule che sovraesprimono l'huntingtina normale i complessi 1 e 2 siano ben evidenti. Situazione opposta è rilevabile nel nucleo. In condizione di sovraespressione di proteina mutata, invece, nel citoplasma (C) i complessi 1 e 2 sono assai poco visibili, mentre risultano ben evidenti nel nucleo (N). Co+ rappresenta il controllo positivo dell'esperimento in cui estratti nucleari di cellule Hela sono stati incubati in presenza della sequenza NRSE radioattiva; come osservato i complessi 1 e 2 sono ben evidenti. Co- è invece il controllo negativo ed è costituito dal solo elemento NRSE radioattivo in assenza di lisato nucleare. In questo caso su di esso non vi è assemblaggio di fattori di trascrizione e quindi assenza dei complessi 1 e 2.

Figura 5

Analisi mediante Western Blotting della distribuzione nel citoplasma (C) e nel nucleo (N) dei fattori trascrizionali in grado di legare la sequenza NRSE. Dalla figura è possibile osservare che, mentre la presenza nel citoplasma e nel nucleo di HDAC1, mSin3a e coREST non varia in modo quantitativo fra cellule esprimenti huntingtina normale (FLwt) e mutata

(Flmu), è evidente invece che il fattore trascrizionale REST si concentra nel citoplasma (C) di cellule FLwt, mentre nel nucleo (N) di tali cellule è scarsamente presente. Al contrario, in cellule Flmu la presenza di REST nel citoplasma (C) è ridotta mentre è evidente un suo accumulo a livello nucleare (N). La valutazione della concentrazione di proteina tubulina negli estratti citoplasmatici e di istone H1 negli estratti nucleari è un importante riferimento quantitativo per l'analisi della distribuzione dei fattori studiati.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda un metodo per la selezione di molecole utili per il trattamento della corea di Huntington, caratterizzato dall'utilizzare la sequenza NRSE come bersaglio molecolare per dette molecole.

Il metodo in oggetto permette di evidenziare quelle molecole che bloccando l'azione silenziatrice della sequenza bersaglio NRSE, riproducono l'effetto neurotrofico e neuroprotettivo dell'huntingtina; l'evidenziazione di tale inibizione, alla base del meccanismo neuroprotettivo fisiologico venuto a mancare nella corea di Huntington, costituisce un metodo di screening, ad elevato valore discriminante, per la selezione di molecole utili per la prevenzione e/o trattamento della corea di Huntington.

Nella sua accezione generale, il metodo prevede di incubare il composto candidato con cellule contenenti la sequenza NRSE e valutare se l'effetto repressivo sulla trascrizione del gene da essa controllato viene inibito.



Per evidenziare e quantificare l'attività dell'elemento NRSE e la sua inibizione è possibile utilizzare cellule ingegnerizzate per contenere stabilmente la sequenza NRSE inserita a monte di un gene reporter, così che l'attività del gene reporter viene regolata dalla sequenza silenziatrice NRSE. Il gene reporter contiene una sequenza di DNA opportunamente modificata, così che la sua espressione, indice dell'attività della sequenza NRSE, possa essere resa visibile mediante analisi chimica, fisica o chimico-fisica. Ogni gene reporter è utilizzabile nella presente invenzione: esempi non limitativi di tali geni sono il gene CAT (cloramfenicoloacetiltransferasi), il gene LUC (luciferasi) oppure il gene GFP (Green Fluorescent Protein); in particolare gli ultimi due presentano il vantaggio di permettere un dosaggio quantitativo automatizzato senza uso di radioattivo.

L'invenzione utilizza, come substrato su cui eseguire il metodo, un sistema cellulare contenente stabilmente nel suo corredo genetico la sequenza NRSE che controlla un gene reporter posto a valle di essa. Il sistema cellulare viene prodotto mediante trasfezione delle cellule con un opportuno vettore che comprende la sequenza NRSE e il gene reporter scelto; le cellule vengono trasfettate in modo da esprimere stabilmente la sequenza NRSE (bersaglio dell'huntingtina) e il grado di attività di tale sequenza viene misurato grazie all'attività del gene reporter. Le cellule componenti il sistema cellulare utilizzato nel saggio sono preferibilmente neuronali e più preferibilmente striatali.

Il vettore di trasfezione contenente la sequenza NRSE a monte di un gene reporter (utilizzabile per produrre il suddetto sistema cellulare),



costituisce un ulteriore oggetto dell'invenzione. Un esempio specifico di tale vettore è costruito NRSE-TK-LUC, prodotto dai Richiedenti e descritto nella parte sperimentale.

Per l'esecuzione del presente metodo di selezione di sostanze attive nel trattamento/prevenzione della corea di Huntington, il composto candidato deve essere aggiunto al sistema cellulare sopra descritto, opportunamente pre-propagato.

In una esemplificazione non limitativa del presente metodo, le cellule vengono propagate alla temperatura compresa tra 30 e 40°C ; l'atmosfera a cui sono esposte le cellule è addizionata del 5% di CO₂; il terreno di coltura è rappresentato dal Dulbecco Modified Eagles Medium (DMEM) contenente Sodio Piruvato in concentrazione di 0.11 g/litro, L-glutamina 2mM, Penicillina /Streptomicina 120 µg/ml e arricchito di Fetal Calf Serum al 10% concentrazione finale; a propagazione ultimata, ad es. dopo 24 ore dalla semina delle cellule, il composto da analizzare viene aggiunto al mezzo di coltura in concentrazioni generalmente comprese fra 1 nM e 10 µM. L'attività dell'elemento NRSE viene valutata a tempi diversi, a partire dalle 6 ore dopo la somministrazione del composto fino a 48-72 ore e viene quantificata applicando la reazione di rilevamento particolare richiesta dal tipo di reporter utilizzato; la reazione di detezione si effettua preferibilmente sui lisati cellulari delle cellule trattate, come noto in letteratura e riportato nella parte sperimentale.

In parallelo al test con il composto candidato, si esegue un test di controllo e cioè si utilizza lo stesso sistema senza incubarlo col composto candidato. Si confrontano quindi i due valori ottenuti.



Un aumento di attività del gene reporter nel campione trattato rispetto al controllo indica che il composto candidato inibisce l'attività dell'elemento NRSE, mimando perciò la funzione dell'huntingtina normale. Tale composto è potenzialmente utile come farmaco per la prevenzione e/o trattamento della corea di Huntington. Un'attività invariata rispetto al controllo indica che il composto candidato non ha attività inibitrice della sequenza NRSE e può essere scartato. Una riduzione di attività rispetto al controllo evidenzia che il composto candidato ha proprietà promotrici l'azione silenziatrice della sequenza NRSE e dunque neurotossiche: in questo caso il metodo può avere utilità, ad es. nella determinazione dell'effetto tossico (pro-coreico) di possibili contaminanti ambientali; tali determinazioni possono rivestire interesse nel controllo della salute ambientale e più in generale per approfondire lo studio dell'eziogenesi della malattia.

Per i composti candidati che hanno mostrato, attraverso il metodo sopra descritto, un potenziale interesse terapeutico, è possibile ripetere il test in condizioni più stringenti, al fine di valutare l'intensità e persistenza dell'effetto inibitorio sulla sequenza NRSE. A questo scopo il composto candidato viene nuovamente analizzato nelle modalità sopra descritte, ma utilizzando in questo caso un sistema cellulare in cui la sequenza NRSE e il gene reporter d'interesse vengono veicolati stabilmente in cellule ingegnerizzate per sovraesprimere huntingtina mutata. Ai fini della presente invenzione, con il termine huntingtina mutata si intende ogni forma di huntingtina che non sia in grado di riprodurre l'effetto fisiologico dell'huntingtina normale, cioè l'inibizione della sequenza



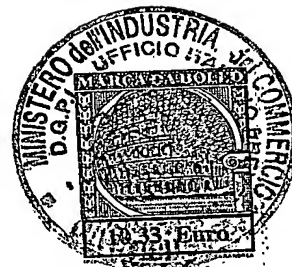
NRSE.

In un sistema cellulare che sovraesprime huntingtina mutata, l'effetto pro-coreico (dovuto alla mancanza dell'azione fisiologica neuroprotettiva dell'huntingtina) è particolarmente presente. Esempi di cellule che sovraesprimono huntingtina mutata sono quelle contenenti il tratto patologico espanso di glutammine; queste cellule ed il loro metodo di ottenimento sono stati precedentemente descritti dai Richiedenti in Rigamonti et al. J.Neurosci. 20(10), 2000, pp.3705-3713, qui incorporata per riferimento.

La persistenza di inibizione dell'NRSE da parte del composto candidato, (che si manifesta con un aumento dell'attività del gene reporter) anche in queste condizioni più stringenti, costituisce un ulteriore elemento di conferma di utilità nel trattamento e/o prevenzione della malattia.

Ulteriori studi condotti dai Richiedenti hanno evidenziato che l'azione dell'huntingtina normale sull'elemento NRSE si esplica specificamente trattenendo nel citoplasma cellulare un fattore di trascrizione necessario affinché la sequenza stessa espliciti la sua azione silenziatrice. Tale fattore, denominato REST (Restriction Element Silencer Factor, Palm et al. J.Neurosci. 18(4), 1998, pp.1280-1296), è una proteina in grado di legare in modo diretto l'elemento NRSE grazie alla presenza di 9 motivi strutturali specifici che consentono la sua interazione con il DNA di tale sequenza.

I Richiedenti hanno dimostrato che in condizioni fisiologiche (cioè in presenza dell'azione protettiva dell'huntingtina normale) il fattore REST viene trattenuto nel citoplasma e trasferito nel nucleo solo in piccole



quantità. In condizioni patologiche (cioè in assenza dell'azione protettiva dell'huntingtina normale e quindi in presenza dell'huntingtina mutata) il fattore REST non viene più ritenuto, ma è trasferito nel nucleo. Una volta all'interno del nucleo, esso avvia l'azione silenziatrice della sequenza NRSE e di conseguenza riduce la produzione di neurotrofina BDNF (figura 5).

Pertanto, in un ulteriore sviluppo della presente invenzione, i composti candidati da testare, ad esempio quelli precedentemente selezionati attraverso il test di inibizione della attività NRSE, possono essere sottoposti ad una analisi per la valutazione della loro capacità di controllare la distribuzione citoplasmatica e nucleare del fattore REST.

Elevati valori citoplasmatici (e/o bassi valori nucleari) di REST sono indice di attività neurotrofica huntingtino-simile e pertanto di potenziale efficacia terapeutica; valori invariati indicano composti inattivi; bassi valori citoplasmatici (e/o alti valori nucleari) sono invece indice di attività neurotossica pro-coreica.

Come substrato su cui evidenziare e quantificare la distribuzione citoplasmatica e nucleare del fattore REST, si utilizzano colture di cellule, preferibilmente neuronali, e più preferibilmente striatali; le cellule possono essere parentali o ingegnerizzate per esprimere huntingtina mutata. Esse vengono incubate con il composto da testare. Al termine dell'incubazione si isolano i lisati proteici citoplasmatici e/o nucleari, che vengono poi analizzati per quantificare (rispetto ai valori basali di cellule non trattate) la variazione dei livelli di REST risultante dal trattamento con il composto candidato. I livelli di REST possono essere analizzati



con tecniche note, ad es. mediante la tecnica di Western Blotting: la proporzione della proteina REST nel citoplasma e nel nucleo di tali cellule é valutata grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali, molecole in grado di riconoscere tale proteina con un elevato grado di specificità.

In alternativa alla tecnica di Western Blotting, i Richiedenti hanno sviluppato un secondo sistema che consente di evidenziare in modo più semplice, ed egualmente efficace, la distribuzione nucleare e citoplasmatica della proteina REST. I Richiedenti hanno prodotto un costrutto di espressione contenente la sequenza di cDNA codificante per la proteina REST fusa al marcatore fluorescente Green Fluorescent Protein (GFP). La sequenza del cDNA per REST, compresa fra i siti di restrizione NcoI e XbaI della lunghezza di 3029 bp (NCBI n° di accesso AB024496) è stata clonata nel vettore pLEGFPN1 (Clontech). Il vettore ottenuto contenente questa sequenza codificante per il prodotto di fusione REST-GFP viene inserito stabilmente nelle suddette cellule. Tali cellule vengono cresciute come descritto in precedenza. Dopo un opportuno tempo di crescita, ad es. 24 ore dalla semina delle cellule, il composto da testare viene aggiunto al mezzo di coltura.

La distribuzione nucleare e citoplasmatica della proteina REST può venire valutata mediante osservazione delle cellule in coltura al microscopio confocale. L'osservazione, rispetto al controllo rappresentato da cellule non trattate, di una intensa fluorescenza verde a livello del citoplasma cellulare (dovuta alla proteina GFP che stimolata da una opportuna lunghezza d'onda, emette una luce verde) indica che il composto somministrato mima la funzione dell'huntingtina normale



trattenendo la proteina REST nel citoplasma cellulare. Tale composto risulta quindi potenzialmente utile nel trattamento della patologia in quanto inibisce l'attività dell'elemento NRSE e trattiene il fattore REST nel citoplasma. L'osservazione di una fluorescenza uguale al controllo è invece indice di assenza di effetto del composto somministrato, mentre un accumulo di fluorescenza verde nel nucleo cellulare indica un'azione neurotossica o pro-coreica.

La valutazione dei livelli di REST può anche essere utilizzato come controllo nel test di inibizione della attività NRSE precedentemente descritto. In questo caso, in aggiunta ai due test effettuati con e senza composto candidato sopra descritti, si aggiunge un terzo test in cui il sistema cellulare viene addizionato di un composto ad azione nota sulla sequenza NRSE (ad es. l'huntingtina normale); l'aumento dell'attività del gene reporter indica che il sistema cellulare utilizzato è correttamente funzionante.

I composti per cui si è rilevata una potenziale attività anti-coreica secondo i metodi qui descritti possono essere sottoposti al successivo iter di sperimentazione farmacologica. Un aspetto di utilità dei metodi sviluppati è la possibilità di selezionare, attraverso un test semplice e che non comporta il sacrificio di animali, una quantità elevatissima di composti candidati (ad esempio serie di omologhi ottenuti per sintesi combinatoriale); il successivo iter di sperimentazione farmacologica sarà quindi limitato ai soli composti che si sono già mostrati attivi nel presente test.

L'invenzione qui descritta rende pertanto disponibile un saggio



biomolecolare di facile esecuzione che può essere applicato routinariamente per selezionare un composto attivo all'interno di una grande quantità di composti.

Come sopra descritto, i Richiedenti hanno evidenziato che l'inibizione della sequenza NRSE da parte dell'huntingtina è il meccanismo neuroprotettivo che viene a mancare nella corea di Huntington. Ciò è causato dall'accumulo nel nucleo di proteina REST, il fattore che legandosi direttamente alla sequenza NRSE è in grado di attivare l'attività silenziatrice di tale elemento.

Pertanto la presente invenzione comprende l'uso di composti NRSE-inibitori e/o che impediscano l'accumulo nucleare del fattore REST nella preparazione di un medicamento utile alla prevenzione e/o trattamento della corea di Huntington.

La presente invenzione viene ora illustrata mediante i seguenti esempi che non hanno funzione di limitazione.

PARTE SPERIMENTALE

1. Modello sperimentale utilizzato

I proponenti hanno a disposizione una linea cellulare immortalizzata ottenuta da cellule embrionali striatali di ratto al 14° giorno di vita embrionale e nota con il nome ST14A (Cattaneo et al., Brain Res. Dev. Brain Res. , 83(2), 1994, p.197-208; Cattaneo & Conti, J.Neurosci.Res., 53(2), 1998, 223-34).

Da queste cellule sono stati precedentemente ottenuti sotto-cloni ingegnerizzati che sovraesprimono huntingtina umana normale o mutata nella forma intera (Rigamonti et al., 2000 op. cit.).



In particolare, oltre alle cellule parentali ST14A, i sotto-cloni impiegati nello studio sono i seguenti:

-FLwt ("Full Length Wild-type"): cellule ST14A ingegnerizzate con il cDNA codificante per huntingtina umana normale intera in cui sono presenti 23 CAG ripetuti.

-Flmu ("Full Length mutant huntingtin"): cellule ST14A ingegnerizzate con il cDNA codificante per huntingtina mutata intera contenente un'espansione di 82 CAG.

Le linee sopracitate vengono mantenute e propagate in terreno di coltura DMEM addizionato del 10% di FCS (fetal calf serum), Na Piruvato 0.11 g/l, L-glutamine 2mM e 120µg/ml Pen-Strep.

Le cellule vengono mantenute in piastre di coltura in incubazione a 33°C in presenza del 5% CO₂ e propagate quando raggiungono il 90 % di confluenza.

Precedenti risultati ottenuti dai proponenti hanno dimostrato che i sottocloni ingegnerizzati esprimono l'huntingtina esogena in maniera costante (Rigamonti et al., 2000 op. cit.) e costituiscono un buon modello *in vitro* per lo studio della funzione dell'huntingtina normale e dei meccanismi biochimici e molecolari alla base della patogenicità dell'huntingtina mutata.

2. Metodiche impiegate

2.1 Trasfezioni stabili e saggio per l'attività del gene reporter luciferasi

- Dopo 24 ore dalla piastratura le cellule vengono trasfettate utilizzando 1-4 microgrammi di costrutto NRSE-TK-LUC. Il metodo di trasfezione utilizzato é quello della Lipofectamina secondo il



protocollo suggerito dalla casa produttrice (Invitrogen/Life Technologies).

- Le cellule vengono poi mantenute per 15gg in presenza di puromicina (agente selettivo caratteristico del costrutto NRSE-TK-LUC) nel medium di coltura al fine di selezionare cloni (gruppo di cellule derivanti da una sola cellula madre) che esprimono stabilmente il costrutto NRSE-TK-LUC e cioè che si è inserito nel genoma delle cellule trasfettate e che si replica insieme ad esso ad ogni divisione cellulare.
- Sui cloni selezionati dovrà essere effettuato un test-prova dell'attività luciferasica allo scopo di controllare che il costrutto si sia inserito in zone del genoma cellulare che ne permettano l'espressione.
- Le cellule che esprimono in modo stabile il costrutto NRSE-TK-LUC vengono piastrate in pozzetti da 2 cm² in una densità pari circa a 85% (1-1.5 X 10⁵ cellule/pozzetto) e messe in presenza del composto da testare.
- A 48 ore dall'aggiunta del composto il terreno di coltura viene completamente rimosso. A questo punto, per ogni pozzetto, si aggiungono 120 µl di tampone di lisi 1X (Luciferase Lysis Buffer 5X: 40mM Tricina pH 7.8, 50mM NaCl, 2mM EDTA, 1mM MgSO₄, 1mM DTT, 1% Triton X-100) e, dopo 5' in incubazione a temperatura ambiente, i lisati vengono trasferiti in tubi mantenuti in ghiaccio. Nel frattempo si prepara il Luciferase Assay Reagent 1X (20mM Tricina; 0.1 mM EDTA; 1.07 mM (MgCO₃)₄Mg(OH)₂·5H₂O; 2.67 mM MgSO₄·7 H₂O; 33.3 mM DTT) a cui sono stati aggiunti 270µM di Coenzima A,




530 μ M di ATP e 470 μ M di luciferina come substrato. A 20 μ l di lisato si aggiungono 100 μ l di Luciferase Assay Reagent 1X e l'attività luciferasica, in presenza di luciferina, viene rilevata mediante un luminometro.

2.2 Trasfezioni stabili, preparazione dei lisati cellulari e saggi per l'attività del gene reporter CAT.

Le cellule sopra indicate seminate in petri da 100 mm di diametro, una volta raggiunta la confluenza, vengono cotransfettate utilizzando 3,5 μ g di DNA plasmidico rappresentato dal costrutto NRSE-TK-CAT e 0,5 μ g di plasmide codificante la B-galattosidasi (controllo interno di efficienza di transfezione). Nel primo costrutto la sequenza inserita, contenente l'elemento NRSE, è composta da 91 paia di basi comprese fra il nucleotide 1873 e 1964 del gene del BDNF di ratto (Timmusk et al., Neuron, 10, 1993 pp 475-489). Questa sequenza è stata inserita nel vettore pBLCAT2 (Luckow and Schutz, Nucl. Acids Res. 15, 1987 p 5490) nel sito di restrizione Sall. Il vettore contenente la B-galattosidasi è pSV-B-Galactosidase (Promega). Il metodo di trasfezione prevede l'utilizzo di Lipofectamina plus e viene effettuato secondo le istruzioni della casa produttrice (Invitrogen/Life Technologies).

A 48 ore dall'aggiunta del composto candidato nel medium di coltura le cellule vengono raccolte, sedimentate e lisate dopo risospensione in 150 μ l di tampone di lisi (15 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8, 1 mM DTT e 0.4 mM PMSF). La metodica di lisi prevede cinque cicli di congelamento e scongelamento (-80°C/37°C) di cinque minuti ciascuno. I lisati vengono centrifugati alla velocità di



14.000 rpm per un tempo di 5 minuti a 4°C: i surnatanti recuperati rappresentano i lisati proteici. Il contenuto di proteine viene valutato secondo il metodo Bradford.

Su una aliquota del campione si effettua il saggio per la misura dell'attività B-galattosidasica secondo la metodica descritta dal Maniatis 1989.

Il saggio reporter CAT viene invece allestito nel modo seguente:

- gli estratti proteici vengono incubati per 15 minuti a 65°C in modo da inattivare le deacetilasi.
- i campioni vengono centrifugati a temperatura ambiente alla velocità di 14.000 rpm per un tempo di 5 minuti.
- vengono recuperati i surnatanti e si allestisce il saggio per la valutazione dell'attività CAT: per ogni campione vengono incubati a 37°C per 2 ore 90 µl di una soluzione contenente 100 µg di proteine con 10 µl di MASTERMIX (0,5 µl di AcetylCoA 70 mg/ml. 0.1 µCi di ¹⁴C-cloramfenicolo e acqua a volume). Le forme acetilate del cloramfenicolo vengono estratte aggiungendo ad ogni campione 500 µl di Etilacetato. Dopo vorticoso agitazione i campioni vengono centrifugati e vengono recuperati i prodotti di reazione facendo asciugare la fase superiore con l'utilizzo di azoto gassoso. Dopo risospensione in 30 µl di Etilacetato i campioni vengono caricati su lastre di silice e separati mediante TLC in una miscela contenente cloroformio e metanolo in rapporto 95:5. Segue asciugatura ed esposizione su lastra autoradiografica Kodak Biomax per 3-5 giorni a -80°C.



Handwritten signature

- Per la valutazione finale dell'attività CAT i prodotti di reazione vengono recuperati dalla lastrina e la radioattività quantificata mediante l'utilizzo di un contatore a scintillazione liquida. I risultati ottenuti vengono normalizzati con l'efficienza di trasfezione.

2.3 Analisi della distribuzione citoplasmatica e nucleare della proteina

REST

(i) Metodica di Western Blotting per l'identificazione della proteina

REST

Cellule cresciute in petri da 100 mm di diametro vengono private del terreno di coltura, lavate con 2 ml di PBS 1X e staccate dopo lenta agitazione attraverso l'utilizzo di 2 ml di una soluzione composta da PBS 1X-EDTA pH8 2mM. Dopo centrifugazione per 5 minuti a 1050 rpm a temperatura ambiente, i pellet di cellule ottenuti vengono immediatamente congelati in ghiaccio secco e conservati alla temperatura di -80°C.

La preparazione di lisati citoplasmatici e nucleari si attua attraverso i seguenti passaggi:

- il pellet di cellule viene risospeso in 100 µl di soluzione A (NaCl 50 mM, Hepes pH8 10 mM, saccarosio 500 mM, EDTA 1 mM, spermidina 0,5 mM, spermina 0,15 mM, Triton X-100 0,2 %) a cui immediatamente prima dell'uso vengono aggiunti un cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma) e PMSF (Phenyl Methyl Sulphonyl Fluoride). Le cellule risospese vengono lasciate in ghiaccio per un tempo di 2 minuti. Il passaggio successivo prevede una

centrifugazione a 4°C per 2 minuti a 6000 rpm. Il surnatante recuperato è l'estratto citoplasmatico.

- Al pellet di cellule vengono in seguito aggiunti 100 µl di soluzione B (NaCl 50 mM, Hepes pH8 10 mM, glicerolo 25%, EDTA 0,1 mM, spermidina 0,5 mM, spermina 0,15 mM) e rimossa immediatamente. Questo passaggio viene ripetuto 3 volte. I campioni vengono centrifugati per un tempo di 30 secondi a 6000 rpm a 4°C e il surnatante viene eliminato.
- Il pellet in seguito viene risospeso in 20 µl di soluzione C (NaCl 350 mM, Hepes pH8 10 mM, glicerolo 25%, EDTA 0,1 mM, spermidina 0,5 mM, spermina 0,15 mM). I campioni vengono mantenuti in ghiaccio per 20 minuti. In seguito vengono centrifugati per 15 minuti a 4°C alla velocità di 14000 rpm: il surnatante recuperato rappresenta l'estratto nucleare.
- i lisati citoplasmatici e nucleari vengono dializzati con una soluzione composta da Hepes pH 7.9 20 mM, glicerolo 20%, NaCl 200 mM, EDTA 0,2 mM, PMSF 0,2 mM e Dtt 0,5 mM per un tempo di 3 ore alla temperatura di 4°C in costante agitazione. In seguito vengono dosate le proteine attraverso il metodo Bradford. 100 µg di proteine dai lisati nucleari e citoplasmatici vengono separate mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 10%. La corsa elettroforetica è condotta a temperatura ambiente a voltaggio costante (150 volt) in un tampone contenente TRIS-HCl 0.025 M, Glicina 0.2 M ed SDS 3.4 mM. A fine corsa si effettua, ad amperaggio costante (250 mA), il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di nitrocellulosa,

preambientata per qualche minuto nel tampone di trasferimento (Glicina 2 M, TRIS-HCl 0.25 M, metanolo 20% e SDS 0,02%) a 4°C. A trasferimento finito, la membrana viene saturata con una soluzione di latte al 5% sciolto in TBS-T 1X (TRIS 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 0.01%) per un'intera notte. La membrana viene poi incubata il giorno seguente in presenza dell'anticorpo monoclonale primario anti-REST (gentilmente fornito da David Anderson, Caltech, California) per due ore a temperatura ambiente. In seguito a ripetuti lavaggi con TBS-T, la membrana viene incubata per un'ora con l'opportuno anticorpo secondario diluito 1:10000 in latte 5% sciolto in TBS-T. Dopo ripetuti lavaggi il segnale autoradiografico è visualizzato mediante analisi di chemiluminescenza (ECL Amersham). La proteina tubulina e l'istone H1 si utilizzano come controllo quantitativo del caricamento.

(ii) Trasfezione stabile di un costrutto di espressione REST-GFP e analisi della distribuzione citoplasmatica e nucleare della proteina di fusione REST-GFP mediante microscopia confocale

La sequenza di cDNA codificante per la proteina REST è stata clonata a monte della Green Fluorescent protein (GFP) nel costrutto pLEGFPNI (Clontech). Tale costrutto viene espresso stabilmente in cellule striatali parentali e sovraesprimenti l'huntingtina mutata precedentemente ingegnerizzate per esprimere un gene reporter regolato dall'elemento NRSE.

I cloni cellulari stabili, il cui ottenimento é sopradescritto, vengono propagati e in seguito ad essi vengono somministrati quei composti in



grado di inibire l'attività dell'elemento NRSE nelle dosi e nei tempi d'azione precedentemente identificati.

Successivamente la distribuzione citoplasmatica e nucleare del fattore REST viene osservata al microscopio confocale alla opportuna lunghezza d'onda che consente di evidenziare la fluorescenza verde emessa dalla proteina GFP.

3. Risultati

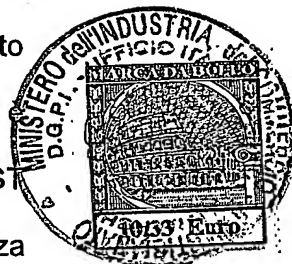
I risultati descritti qui di seguito identificano, all'interno del promotore II del gene BDNF, l'elemento specifico di DNA su cui l'huntingtina normale esplica il proprio effetto. Si tratta dell'elemento NRSE, una sequenza che, una volta attivata, blocca l'espressione dei geni da essa controllati.

Inoltre, viene descritto il meccanismo attraverso cui si spiega l'effetto dell'huntingtina normale sulla sequenza NRSE e cioè che tale proteina in grado di trattenere nel citoplasma il fattore trascrizionale REST riducendone la sua disponibilità nucleare. La riduzione della presenza nel nucleo di tale proteina, decisiva per l'attivazione della sequenza silenziatrice NRSE, determina l'inibizione della sua attività silenziatrice consentendo l'espressione della neurotrofina BDNF.

I dati ottenuti indicano di conseguenza la disponibilità di un bersaglio molecolare che puo' essere sfruttato per la ricerca di farmaci attivi nella patologia, cioè che funzionino, come l'huntingtina normale sull'elemento NRSE stimolando la trascrizione del BDNF.

(i) Identificazione dell'elemento NRSE come bersaglio dell'azione dell'huntingtina

Al fine di individuare la porzione specifica all'interno delle 1100 paia di



basi (corrispondenti al promotore II e a parte della sequenza regolatoria immediatamente a monte, **Figura 1**) sulla quale l'huntingtina normale esercita il proprio effetto, i Richiedenti hanno utilizzato diversi frammenti di DNA, ottenuti da delezioni della sequenza di 1100 paia di basi, inseriti in vettori plasmidici, a dirigere una specifica sequenza rappresentata dal gene CAT (cloramfenilcolacetiltransferasi) la cui espressione può essere facilmente identificata attraverso un saggio di tipo chimico.

Una volta che tale costrutto è stato inserito all'interno del sistema cellulare, l'attività dell'enzima acetilcloramfenicoltransferasi, e di conseguenza della sequenza regolatoria a monte, è valutata in base alla quantità di substrato cloramfenicolo che esso è in grado di convertire nei corrispondenti prodotti finali di reazione. Tali prodotti sono isolati tramite cromatografia su strato sottile ed in seguito quantificati.

I costrutti utilizzati sono i seguenti:

- BDNF II 1,1 CAT: contiene una sequenza di 1,1 Kb compresa fra i siti di restrizione HindIII -SacI comprensiva di una porzione del promotore II e della regione a monte contenente un elemento NRSE.
- BDNF II 0,3 CAT: contiene una sequenza di 300 bp comprensiva della stessa porzione di promotore II del vettore indicato nel punto precedente. Deleto, a partire dal 5', rispetto al costrutto precedente, mantiene comunque l'elemento NRSE.
- BDNF II 0,3 MUT CAT: contiene una sequenza di 300 bp comprensiva della stessa porzione di promotore II presente nel vettore precedente, ma con elemento NRSE mutato.



I costrutti BDNF II 1,1 CAT e BDNF II 0,3 CAT sono stati transfettati indipendentemente in modo transiente in cellule ST14A parentali ed in cellule ST14A ingegnerizzate per sovraesprimere l'huntingtina normale o mutata (Rigamonti et al., 2000 op. cit.). Dopo la transfezione è stata valutata l'attività CAT: in presenza di huntingtina normale sovraespressa si è osservato un aumento di attività CAT rispetto al controllo, al contrario in presenza della proteina mutata tale attività si riduce nel confronto con le cellule parentali (figura 2, pannelli A e B e Tabella I).

TABELLA I

	BDNF II 1.1 CAT	BDNF II 0.3 CAT
P	1851.5+/-450	4875+/-245
FLwt	18062+/-975 **	8549+/-315 **
FLmu	494.5+/-280 *	2845+/-177 *

La tabella I riporta l'analisi quantitativa dei prodotti di acetilazione (cloramfenicolo acetilato, indicato dalla freccia in fig. 2) mostrati negli esperimenti del pannello A e B. I dati di attività CAT, espressi in cpm (conte per minuto)/microgrammi di proteine/efficienza di trasfezione rappresentano le medie con le rispettive deviazioni standard di tre esperimenti diversi. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ verso P, ANOVA Test. Per la quantizzazione le aree corrispondenti al prodotto acetilato sono state isolate dalla lastra TLC e sottoposte a conta mediante liquido di scintillazione.

Lo stesso saggio è stato ripetuto utilizzando il plasmide BDNF II 0,3 MUT CAT in cellule parentali (P) o sovraesprimenti huntingtina normale (FLwt) e mutata (FLmu). Il costrutto BDNF II 0,3 MUT CAT contiene la

stessa sequenza di promotore II composta da 300 paia di basi riportata nella figura 2, in cui però l'elemento NRSE in precedenza è stato così mutato:

5'-TCCgggacGCAgaTTtACAGAGCCAGCGGATTTGTtGAcaTGGTAG
TACTT3' (le basi differenti dal normale sono indicate in minuscolo).

I risultati sono esposti in tabella II, in cui i dati sono espressi in cpm (conte per minuto)/microgrammi di proteine/efficienza di trasfezione e rappresentano le medie con le rispettive deviazioni standard di tre esperimenti).


Tabella II

	BDNF II 0.3 MUT CAT
P	4875+/-245
FLwt	5214+/-915
FLmu	3287+/-875

La tabella dimostra che in presenza dell'elemento NRSE mutato l'attività CAT in cellule FLwt e FLmu non subisce variazioni significative rispetto al controllo rappresentato dalle cellule parentali (P); pertanto sia in presenza di proteina normale che in presenza di proteina mutata, non vi è alcuna modulazione dell'attività CAT rispetto al controllo.

Questo significa che i Richiedenti hanno individuato la sequenza minima di DNA necessaria perchè l'huntingtina normale eserciti la sua azione sulla trascrizione del gene BDNF: è la sequenza consenso NRSE.

(ii) L'huntingtina normale stimola l'espressione di altri geni regolati dall'elemento NRSE



Come già descritto in precedenza, l'elemento NRSE è una sequenza che, una volta attivata dal legame con specifiche proteine, blocca l'espressione del gene da essa controllato.

La sequenza NRSE è localizzata nel promotore di molti geni responsabili della sopravvivenza e del mantenimento del fenotipo neuronale. Si tratta di recettori per neurotrasmettitori, canali ionici, enzimi che sono alla base della sintesi di neurotrasmettitori, neuropeptidi, molecole di adesione cellulare, proteine di vescicole sinaptiche e componenti del citoscheletro. Sulla base dei risultati originali qui indicati, che dimostrano che la modulazione huntingtina-mediata dell'espressione del BDNF si attua attraverso la sequenza NRSE, i richiedenti hanno cercato di identificare se l'espressione di altri geni regolati dall'elemento NRSE potesse essere influenzata dall'huntingtina normale in modo analogo a quanto osservato per il BDNF.

I richiedenti hanno sintetizzato primers per alcuni di questi geni ed allestito esperimenti di RT-PCR semiquantitativa radioattiva per verificare il loro stato di espressione in cellule esprimenti huntingtina normale o mutata. Osservando la figura 3 è possibile notare come in presenza di huntingtina normale la loro espressione sia più elevata rispetto alle cellule controllo e come essa drasticamente si riduca in presenza della proteina mutata.

Questo sottolinea che, oltre al gene del BDNF, l'huntingtina normale è in grado di regolare un gruppo ben definito di geni, quelli la cui espressione è controllata dall'elemento NRSE.



(iii) Sviluppo di un sistema cellulare che esprima preferenzialmente l'NRSE, bersaglio dell'azione dell'huntingtina

Per sfruttare questo meccanismo regolatorio dell'huntingtina al fine di identificare farmaci attivi nella malattia, i richiedenti hanno di conseguenza costruito il seguente vettore:

- NRSE-TK-LUC: esso è stato ottenuto dal vettore NRSE-TK-CAT (ottenuto dall'inserzione della sequenza NRSE a monte del promotore TK nel plasmide pBLCAT2) mediante sostituzione del reporter CAT con il gene codificante per la luciferasi (exciso dal plasmide pGL3luciferasi, Promega).

Questo costrutto è stato espresso in modo transiente nel sistema cellulare indicato sopra e si è potuto osservare che in cellule sovraesprimenti l'huntingtina normale, l'attività luciferasica è significativamente più elevata; al contrario in presenza della proteina mutata essa è inferiore a quella osservata nel basale di controllo.

(iv) l'huntingtina inibisce l'attività dell'NRSE sequestrando nel citoplasma il fattore di trascrizione REST, elemento determinante per l'attivazione dell'elemento NRSE e del suo effetto inibitorio.

I richiedenti hanno approfondito in seguito lo studio dei meccanismi attraverso cui l'huntingtina svolge la sua azione sull'elemento NRSE ed hanno identificato che la proteina nella forma normale regola l'entrata nel nucleo dei fattori trascrizionali leganti l'NRSE (figura 4). Con la presenza della mutazione la proteina perde questa capacità, con il conseguente accumulo nel nucleo di fattori trascrizionali. Da questo consegue un aumento dell'attività repressiva dell'elemento NRSE.



Evidenze di ciò sono state ottenute attraverso un esperimento di EMSA (Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay) mostrato in **figura 4**. Attraverso questo saggio i Richiedenti hanno dimostrato che:

- in cellule sovraesprimenti la proteina huntingtina normale, i complessi, che si formano fra la sequenza NRSE e i fattori che, legandosi ad essa, sono in grado di attivarla, sono maggiormente presenti a livello citoplasmatico. Il segnale nucleare è invece molto debole.
- In cellule sovraesprimenti la proteina mutata tali complessi sono molto evidenti nel nucleo e tendono a scomparire nel citoplasma cellulare.

Ulteriori esperimenti di Western Blotting, mirati a identificare la distribuzione citoplasmatica e nucleare dei fattori che legano l'elemento NRSE e che sono in grado di attivarlo, dimostrano che non si riscontra una diversa localizzazione tra citoplasma e nucleo, in presenza di huntingtina normale o mutata, dei fattori trascrizionali mSin3A, HDAC1, CoRest rispetto alle cellule controllo (**Figura 5, pannello A**). Si è osservato, invece, che il fattore REST, la proteina più importante di questo complesso perché in grado di legare in modo diretto la sequenza NRSE e di reclutare gli altri fattori del complesso trascrizionale, resta nel citoplasma di cellule con huntingtina normale, mentre diminuisce dal citoplasma di cellule con huntingtina mutata per accumularsi nel nucleo (**figura 5, pannello B**).

Ciò dimostra che l'azione stimolante dell'huntingtina normale nei confronti del BDNF si esplica sequestrando nel citoplasma il fattore di

trascrizione REST necessario per attivare la sequenza silenziatrice
NRSE.



RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la selezione di molecole attive nella prevenzione e/o trattamento della corea di Huntington caratterizzato dal valutare la capacità di dette molecole nell'inibire l'attività della sequenza NRSE.
2. Metodo in accordo con la rivendicazione 1, comprendente i seguenti passaggi:
 - (a) Incubazione di dette molecole con un sistema di cellule ingegnerizzate per contenere stabilmente la sequenza NRSE inserita a monte di un gene reporter.
 - (b) Valutazione dell'inibizione dell'attività della sequenza NRSE attraverso la misura dell'attività del gene reporter.
3. Metodo secondo la rivendicazione 2, dove il gene reporter è scelto tra il gene che codifica per la cloramfenicoloacetiltransferasi, la luciferasi, o la Green Fluorescent Protein.
4. Metodo secondo le rivendicazioni 2-3, dove dette cellule sono cellule che esprimono huntingtina mutata.
5. Metodo secondo le rivendicazioni 2-4, comprendente ulteriormente la valutazione dei quantitativi di fattore REST citoplasmatico e/o nucleare in dette cellule.
6. Sistema cellulare per l'esecuzione del metodo descritto nelle rivendicazioni 1-5, caratterizzato dal fatto che le cellule che lo compongono sono ingegnerizzate per contenere stabilmente la sequenza NRSE inserita a monte di un gene reporter.
7. Sistema cellulare secondo la rivendicazione 6, dove il gene reporter è scelto tra il gene per la cloramfenicoloacetiltransferasi, per la



luciferasi oppure per la Green Fluorescent Protein.


8. Sistema cellulare secondo le rivendicazioni 6-7, le cui cellule sono cellule neuronali.
9. Sistema cellulare secondo la rivendicazione 8, le cui cellule sono striatali.
10. Sistema cellulare secondo le rivendicazioni 6-9 , le cui cellule sono cellule parentali o cellule esprimenti huntingtina mutata.
11. Processo per la produzione del sistema cellulare descritto nelle rivendicazioni 6-10 , caratterizzato da:
 - (a) predisporre un vettore comprendente la sequenza NRSE inserita a monte di un gene reporter, e
 - (b) transfettare le cellule del sistema mediante detto vettore.
12. Processo secondo la rivendicazione 11, in cui il vettore è il costrutto NRSE-TK-LUC.
13. Vettore di transfezione, utilizzabile nel processo delle rivendicazioni 11-12, la cui struttura comprende la sequenza NRSE inserita a monte di un gene reporter.
14. Vettore di transfezione secondo la rivendicazione 13, dove il gene reporter è scelto tra il gene per la cloramfenicoloacetiltransferasi, per la luciferasi oppure per la Green Fluorescent Protein
15. Vettore secondo la rivendicazione 13, costituito dal costrutto NRSE-TK-LUC.
16. Metodo per la selezione di molecole attive nella prevenzione e/o trattamento della corea di Huntington caratterizzato da:
 - (a) Incubare dette molecole con un sistema di cellule

(b) Valutare la diminuzione di fattore REST nel citoplasma e/o l'aumento

di fattore REST nel nucleo di dette cellule.

17. Uso di composti NRSE-inibitori nella preparazione di un medicamento utile alla prevenzione e/o trattamento della corea di Huntington.

18. Composto NRSE-inibitore, individuato mediante il metodo descritto nelle rivendicazioni 1-5, 16.

(GER/pd) 

Milano, li 17 Aprile 2002

p. UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

il Mandatario

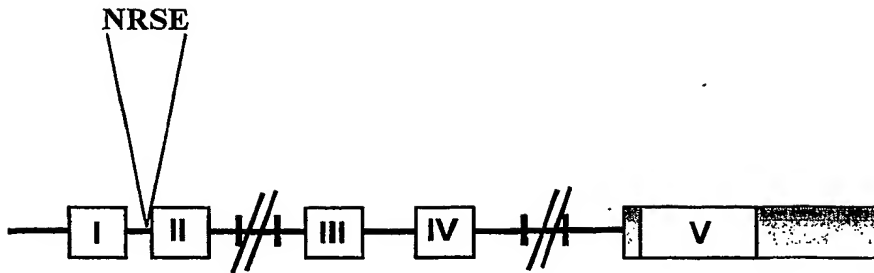

Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.



Chini

Figura 1



MF 2002 A 0 0 0 8 0 9

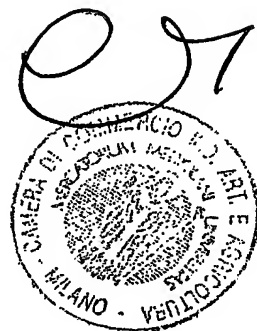
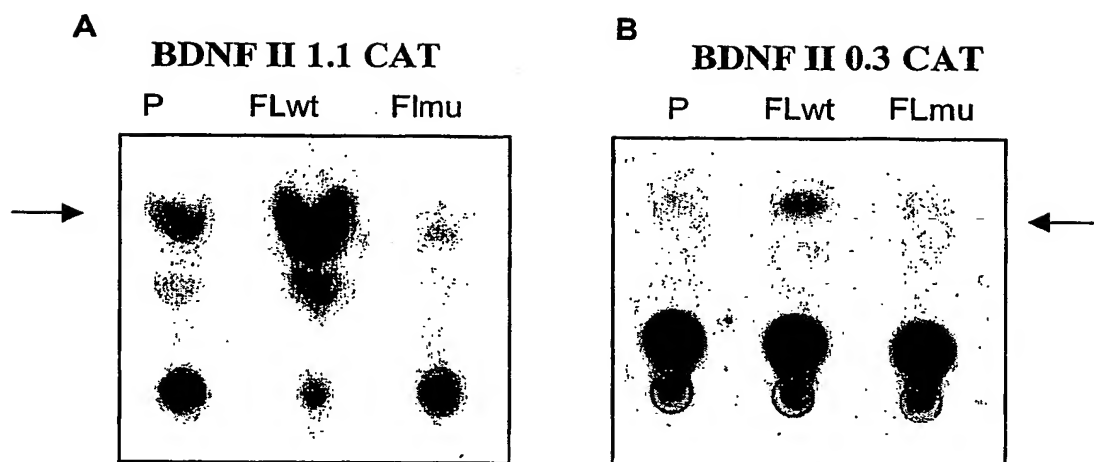
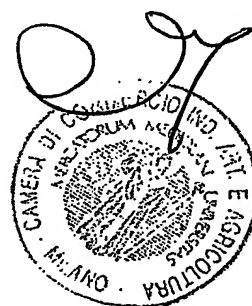


Figura 2



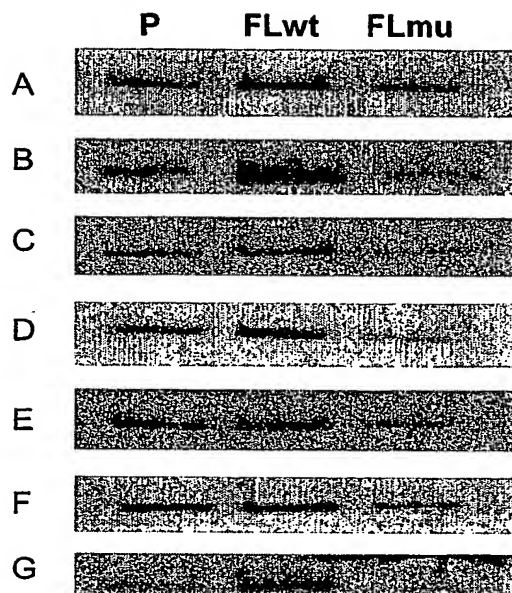
MI 2002A 000809



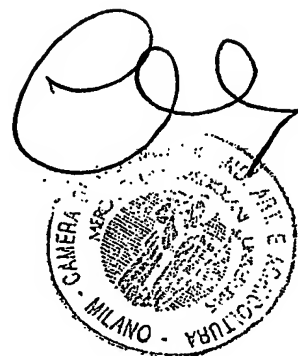
BEST AVAILABLE COPY

g. Chini

Figura 3



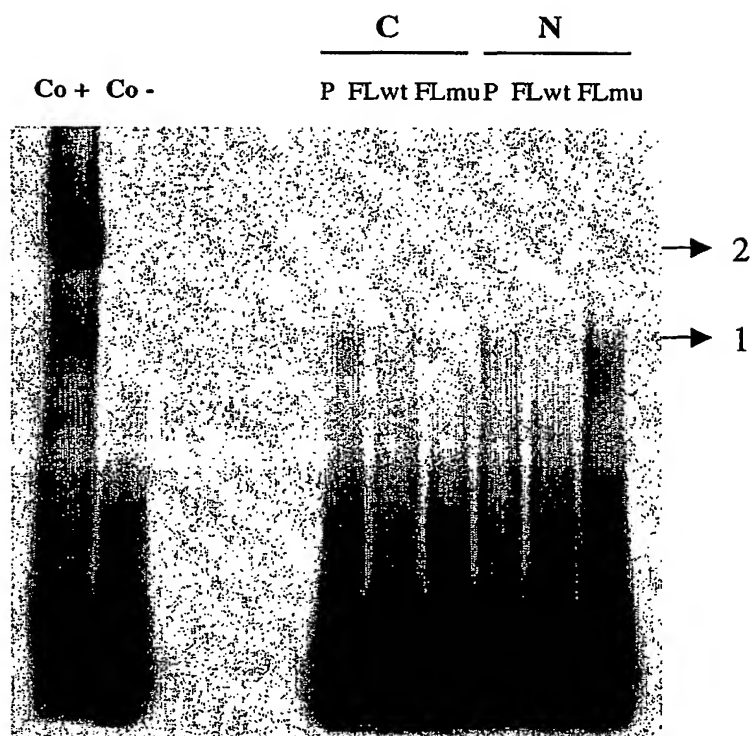
MI 2002 A 0 0 0 8 0 9



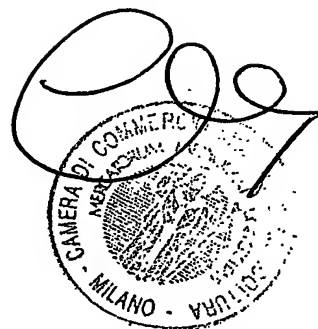
BEST AVAILABLE COPY

Figura 4

Alini



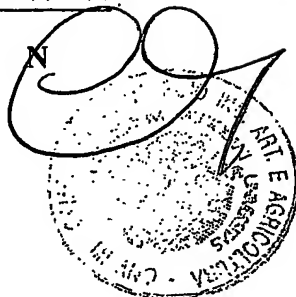
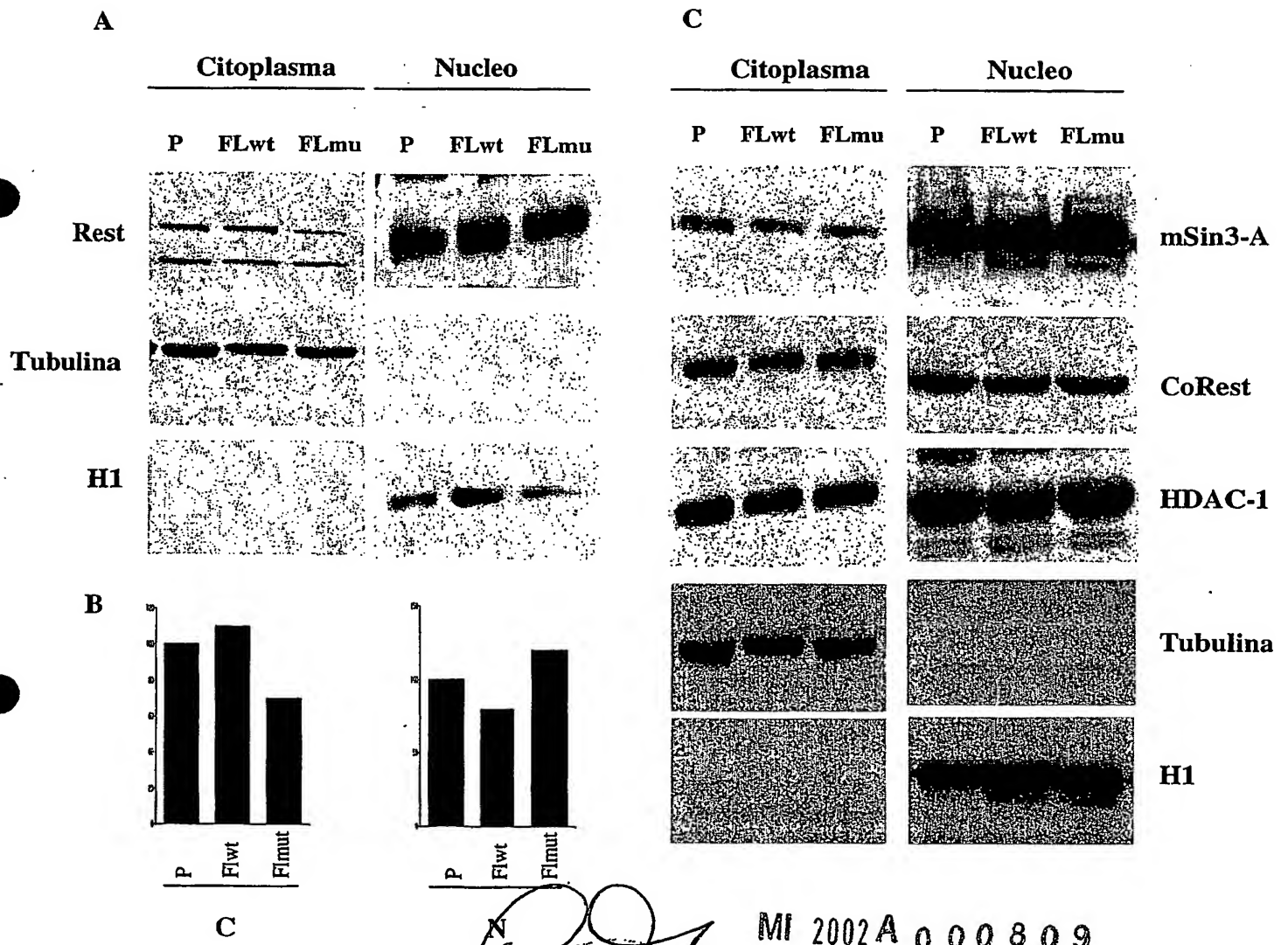
MI 2002 A 000809



BEST AVAILABLE COPY

J. Allin

Figura 5



MI 2002 A 0 0 0 8 0 9